



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :

A01K 67/027, C12Q 1/00, C07K 14/47,  
16/18

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 97/33466

(43) Date de publication internationale: 18 septembre 1997 (18.09.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00469

(22) Date de dépôt international: 14 mars 1997 (14.03.97)

(30) Données relatives à la priorité:

96/03417

14 mars 1996 (14.03.96)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO  
MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy-  
l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RIEGER, François  
[FR/FR]; 8, rue Lagarde, F-75005 Paris (FR). PERRON,  
Hervé [FR/FR]; 134, rue du Docteur-Edmond-Locard, F-  
69005 Lyon (FR). BENJELLOUN, Nabila [FR/FR]; 7, rue  
de l'Essonnes, F-91000 Evry (FR).(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte  
postale 6153, F-69466 Lyon Cédex 06 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,  
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH,  
HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD,  
SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NON-GENETICALLY MODIFIED MAMMAL AS A MODEL FOR MULTIPLE SCLEROSIS

(54) Titre: MAMMIFERE NON GENETIQUEMENT MODIFIE, MODELE POUR LA SCLEROSE EN PLAQUES

(57) Abstract

A non-human mammal genetically modified without affecting its genome and having any two of the following pathological signs: (a) a blood-brain barrier that is open or permeable to water-soluble blood molecules non-specific for the cerebral parenchyma, (b) an astrocyte disorder revealed particularly by physical network disorganisation, the disappearance of perivascular feet around the capillaries, and gliosis, (c) microglial cell activation, (d) demyelination plates, particularly in the brain stem and/or the cerebral white matter, and (e) central nervous system glial and endothelial cell lesions, as well as the uses of said animal, are disclosed.

(57) Abrégé

Animal mammifère, non humain, modifié sans affecter son génome, possédant au moins deux quelconques des signes pathologiques suivants: (a) une barrière hématoencéphalique ouverte ou perméable aux molécules hydrosolubles du sang non spécifiques du parenchyme cérébral; (b) une atteinte astrocytaire notamment révélée par la désorganisation des réseaux physiologiques, par une disparition des pieds astrocytaires autour des vaisseaux capillaires et par une gliose; (c) une activation des cellules microgliales; (d) des plaques de démyélinisation, notamment présentes dans le tronc cérébral et/ou la substance blanche cérébelleuse; (e) des lésions des cellules gliales et des cellules endothéliales du système nerveux central, et utilisations de l'animal.



BEST AVAILABLE COPY

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brézil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Caméroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## MAMMIFERE NON GENETIQUEMENT MODIFIE, MODELE POUR LA SCLEROSE EN PLAQUES

La présente invention concerne l'obtention d'un  
5 animal mammifère, non humain, modifié, présentant une  
physiopathologie similaire à celle de patients atteints de  
sclérose en plaques (SEP), ainsi que les utilisations de  
l'animal ainsi obtenu.

Une altération de la barrière hématoencéphalique  
10 (BHE) semble être un élément crucial dans le développement  
des lésions de la sclérose en plaques (SEP) (Gay & Esiri  
1991, Hawkins & col 1991, Thompson & col 1992, Poser  
1993). Il semble qu'une prédisposition génétique, combinée  
à un agent pathogène, peut-être d'origine virale, puisse  
15 entraîner ces lésions puis que se développe un processus  
inflammatoire et auto-immun démyélinisant (Waksman 1985).  
Les observations de Perron & col (1989, 1991) d'une  
activité transcriptase inverse (RT), et de la présence de  
particules virales dans des lignées de cellules  
20 leptoméningées et des monocytes en culture de patients  
atteints de SEP, apportent des arguments compatibles avec  
une étiologie virale, plus particulièrement rétrovirale,  
de la SEP. Une hypothèse récemment vérifiée par les  
présents inventeurs, est que, dans la SEP, des monocytes  
25 probablement infectés par un rétrovirus soient  
susceptibles de libérer des molécules gliotoxiques in  
vitro. En effet, le surnageant de monocytes prélevés chez  
des patients SEP en phase de poussée et mis en culture in  
vitro, ajouté au milieu de culture d'explants de cortex de  
30 rat embryonnaire a montré une toxicité ciblée  
préférentiellement sur les astrocytes (voir la demande de  
brevet PCT/FR95/00178 déposée au nom de la Demanderesse et  
dont le contenu est incorporé dans la présente description  
par référence). La purification du surnageant de monocytes  
35 de patients atteints de SEP, actif in vitro, a mis en  
évidence un facteur toxique représenté majoritairement par

une fraction de 17 Kd et une bande associée minoritaire de 21 Kd. Ce facteur induit une mort par apoptose de lignées d'astrocytes, et aussi d'oligodendrocytes, in vitro (voir la demande de brevet PCT/FR95/00178). Ces deux fractions  
5 se retrouvent également dans le liquide céphalorachidien (LCR) et sérums de patients atteints de SEP (Dobransky & col soumis).

Les auteurs ont découvert que, de manière surprenante, l'inoculation du facteur toxique défini ci-dessus chez un animal, provoquait chez ce dernier,  
10 l'apparition de lésions physiopathologiques, en particulier cérébrales, de même nature que celles observées chez les patients atteints de sclérose en plaques.

15 Ainsi, la présente invention concerne un animal mammifère, non humain, modifié, chez lequel on observe des signes ou anomalies caractéristiques de la sclérose en plaques quand elles sont observées chez l'homme.

Par animal modifié selon l'invention, on entend un  
20 animal qui, par rapport à un animal témoin de même famille, de même genre et de même espèce, a subi une modification volontaire. Cette modification volontaire n'affecte pas le génome de l'animal et en particulier l'animal n'est pas transgénique. Elle se caractérise  
25 essentiellement par un état physiopathologique lié à une infection de l'animal par le facteur gliotoxique tel qu'obtenu à partir de liquide biologique prélevé chez des patients atteints de sclérose en plaques.

Les différents objets de l'invention sont les  
30 suivants :

- un animal mammifère, non humain, modifié sans affecter son génome, possédant au moins deux quelconques des signes ou anomalies suivants : (a) une barrière hématoencéphalique ouverte ou perméable aux molécules  
35 hydrosolubles du sang non spécifiques du parenchyme cérébral ; (b) une atteinte astrocytaire notamment révélée

par la désorganisation des réseaux physiologiques, par une disparition des pieds astrocytaires autour des vaisseaux capillaires et par une gliose ; (c) une activation des cellules microgliales ; (d) des plaques de  
5 démyélinisation, notamment présentes dans le tronc cérébral et/ou la substance blanche cérébelleuse ; (e) des lésions des cellules gliales et des cellules endothéliales du système nerveux central, en particulier une modification de la morphologie et/ou une fragmentation au  
10 moins partielle de l'ADN des cellules gliales de type astrocytaire, à distance du point d'injection ; de préférence, l'animal possède au moins deux des signes pathologiques (a), (d) et (e) ; selon une autre variante de l'invention, l'animal possède tous les signes (a), (b),  
15 (c), (d) et (e) ;

- un animal mammifère, non humain, modifié sans affecter son génome, susceptible d'être obtenu par inoculation du facteur gliotoxique tel qu'obtenu dans une culture de monocytes ou dans un liquide biologique de  
20 patients atteints de sclérose en plaques ;

- un procédé d'obtention d'un animal tel que défini précédemment, comprenant les étapes consistant à :

\* disposer d'une quantité infectante de facteur gliotoxique, tel qu'obtenu à partir d'une culture de  
25 monocytes ou à partir d'un liquide biologique d'un patient atteint de sclérose en plaques,

\* inoculer ladite quantité infectante à l'animal ;

- l'utilisation d'un animal de l'invention pour mesurer l'efficacité d'un procédé thérapeutique notamment  
30 d'un agent médicamenteux, anti-inflammatoire ou anti-toxique ;

- l'utilisation d'un animal de l'invention, pour mesurer l'efficacité d'un procédé thérapeutique notamment d'un agent médicamenteux, destiné au traitement de la  
35 sclérose en plaques ;

- l'utilisation d'un animal de l'invention pour déterminer la nocuité ou l'innocuité d'un procédé thérapeutique notamment d'un agent médicamenteux, sur le cerveau pathologique de l'animal décrit ;
- 5       - un procédé pour mesurer l'efficacité d'un procédé thérapeutique notamment d'un agent médicamenteux, anti-inflammatoire, comprenant les étapes consistant à :
  - \* disposer d'un animal de l'invention,
  - \* administrer ledit procédé thérapeutique à
  - 10 l'animal,
  - \* mesurer l'efficacité du procédé thérapeutique en observant la réduction ou l'absence du ou des signes pathologiques décrits précédemment, par rapport à un animal témoin malade ayant reçu le facteur gliotoxique,
  - 15 mais n'ayant pas reçu le procédé thérapeutique, et en référence à un témoin normal traité par ledit procédé thérapeutique mais n'ayant pas reçu de facteur gliotoxique ;
  - un procédé pour mesurer l'efficacité d'un
  - 20 procédé thérapeutique notamment un agent médicamenteux, destiné au traitement de la sclérose en plaques, comprenant les étapes consistant à :
    - \* disposer d'un animal de l'invention,
    - \* administrer ledit procédé thérapeutique à
    - 25 l'animal,
    - \* mesurer l'efficacité du procédé thérapeutique en observant la réduction ou l'absence du ou des signes pathologiques décrits précédemment, par rapport à un animal témoin malade ayant reçu le facteur gliotoxique,
    - 30 mais n'ayant pas reçu ledit procédé thérapeutique, et en référence à un témoin normal traité par ledit procédé thérapeutique mais n'ayant pas reçu de facteur gliotoxique ;
    - un procédé pour déterminer la nocuité ou
    - 35 l'innocuité d'un procédé thérapeutique notamment d'un agent médicamenteux, sur le cerveau pathologique de

l'animal de l'invention, comprenant les étapes consistant à:

- \* disposer d'un animal de l'invention,
  - \* administrer ledit procédé thérapeutique à
- 5 l'animal,

\* mesurer la réponse au procédé thérapeutique par une observation histopathologique étudiant les critères précédemment décrits.

Une autre utilisation de l'animal modifié selon  
10 l'invention réside dans l'obtention d'hybridomes susceptibles de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur gliotoxique et issus de lymphocytes B prélevés sur ledit animal et fusionnés avec des cellules tumorales adaptées à l'obtention d'hybridomes (hybridomes  
15 rat/rat ou rat/souris selon Köhler et Milstein 1975). Ainsi l'invention concerne un procédé de production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur gliotoxique et/ou contre des molécules induites ou modifiées par les effets du facteur gliotoxique,  
20 comprenant les étapes consistant à fusionner des lymphocytes B prélevés sur un animal de l'invention, avec des cellules tumorales appropriées, et à faire produire par l'hybridome issu après sélection, lesdits anticorps.

L'invention a également pour objet un anticorps  
25 monoclonal dirigé contre le facteur gliotoxique et/ou contre des molécules induites ou modifiées par les effets du facteur gliotoxique, susceptible d'être obtenu par le procédé ci-dessus.

De préférence l'animal modifié selon la présente  
30 invention appartient à la famille des muridés, en particulier il s'agit d'une souris ou d'un rat. Mais l'animal de l'invention pourrait être un singe ou un cochon d'Inde.

La partie expérimentale ci-après regroupant les  
35 exemples 1 à 3 en relation avec les figures 1 à 11, illustre l'effet pathologique du facteur gliotoxique in

vivo chez des rates, et la détermination de cet effet permet d'établir la liaison avec les processus lésionnels observés dans la SEP. Dans les exemples 1 à 2 on examine l'évolution des lésions affectant les astrocytes, après  
5 injection intraventriculaire de ce facteur chez le rat.

La figure 1 est une photographie montrant l'organisation et l'orientation des astrocytes périventriculaires après injection du facteur toxique :

Fig. 1A : témoins : les cellules GFAP<sup>+</sup> proches du  
10 ventricule latéral gauche sont de type fibreux ; les corps cellulaires sont densément marqués ; les prolongements sont relativement épais ; les cellules GFAP<sup>+</sup> sont orientées parallèlement au plan de coupe (coupe verticofrontale) ;

15 Fig. 1B : rates traitées par le facteur toxique : les cellules GFAP<sup>+</sup> observées à proximité du ventricule latéral gauche ont un soma hypertrophié et/ou polymorphe avec une désorganisation des extensions cytoplasmiques ; l'orientation de ces cellules est perpendiculaire au plan  
20 de coupe et l'organisation des cellules est palissadique ;

Fig. 1C : à plus fort grossissement de Fig. 1B, on observe un astrocyte normal ;

Fig. 1D : à plus fort grossissement de Fig. 1B, on observe un astrocyte dont les prolongements cytoplasmiques  
25 sont orientés vers le ventricule latéral gauche ;

Barre : A, B (20  $\mu$ m) C,D (60  $\mu$ m)

La Figure 2 illustre des nodules dans le SNC de rats traités par le facteur toxique :

Fig. 2A : dans le striatum des rates témoins, les  
30 cellules GFAP<sup>+</sup> sont de petite taille, de forme étoilée, les prolongements sont courts et fins ;

Fig. 2B : chez les rates traitées par le facteur, les corps astrocytaires sont hypertrophiés, et ont des prolongements cytoplasmiques anormaux (très fins et  
35 nombreux) ;



Fig. 2C : chez les rates traitées par le facteur, on observe des nodules dans le striatum ;

Barre : 20  $\mu$ m

Figure 3 représente l'organisation des astrocytes péricerviculaires suite à l'injection du facteur gliotoxique :

Fig. 3A : chez les rats témoins, les prolongements astrocytaires forment des patchs immunoréactifs GFAP<sup>+</sup> autour des vaisseaux ;

Fig. 3B : chez les rates traitées, les prolongements astrocytaires autour des vaisseaux ont régressé ou disparu ; on observe en outre une "déplétion" de l'environnement vasculaire en astrocytes ;

Fig. 3C : chez les rates traitées, à proximité de certains vaisseaux, des foyers de gliose astrocytaire se forment ; les astrocytes sont densément marqués à la GFAP ; les prolongements cytoplasmiques sont plus épais ;

Barre : 40  $\mu$ m

La Figure 4 montre la distribution des astrocytes dans le cortex, 10 jours après lésion :

Fig. 4A : chez les animaux témoins, dans la zone marginale du cortex piriforme, les astrocytes ont un aspect de "chandelles" et leurs prolongements cytoplasmiques sont orientés vers la pia perpendiculairement à sa surface ;

Fig. 4B : dans la couche I du cortex piriforme chez les rates traitées, on observe une modification structurale des cellules GFAP<sup>+</sup> qui ont perdu leur orientation physiologique ; on observe une désorganisation de la glia limitans établie par les prolongements astrocytaires ;

Fig. 4C : chez les animaux témoins, dans les couches II et III du cortex, les cellules GFAP<sup>+</sup> ont une forme étoilée ; les prolongements cytoplasmiques nombreux occupent l'espace intercellulaire ;

Fig. 4D : chez les rates traitées, on observe une régression des prolongements cytoplasmiques, une augmentation de l'espace intercellulaire et une perte de la morphologie "étoilée" des astrocytes ;

5           Barre : 40  $\mu$ m

La Figure 5 met en évidence la fragmentation de l'ADN cellulaire par la technique TUNEL après traitement par le facteur toxique :

Fig. 5A : chez les rates traitées, on observe les  
10 cellules TUNEL<sup>+</sup> dans la paroi des ventricules latéraux ;

Fig. 5B : chez les rates traitées, observation dans la substance blanche du cervelet ;

Fig. 5C : chez les rates traitées, observation dans la couche des grains du cervelet ;

15           Fig. 5D : chez les rates traitées, observation au niveau des vaisseaux arachnoïdiens ;

Fig. 5E : chez les rates traitées, on observe que dans le cervelet, l'ADN fragmenté se retrouve dans le cytoplasme ;

20           Fig. 5F : chez les rates traitées, on observe les cellules TUNEL<sup>+</sup> dans les plexus choroïdes, avec une contre coloration à l'hématoxyline ;

Barre : 40  $\mu$ m

25           La Figure 6 : chez des rates traitées par le facteur toxique, des cellules GFAP positives sont TUNEL positives ; des cellules endothéliales sont parfois aussi TUNEL positives :

Fig. 6A : cellules GFAP<sup>+</sup> (bleu), également TUNEL<sup>+</sup> (marron) dans le cortex ;

30           Fig. 6B : dans le striatum ; on observe l'absence des prolongements cytoplasmiques et l'atténuation du marquage GFAP ;

Fig. 6C : cellule doublement marquée GFAP/TUNEL dans le cervelet ;

Fig. 6D : cellules doublement marquées (FVIII/TUNEL) dans la paroi vasculaire ; le marquage du FVIII est très faible ;

Barre : 40  $\mu$ m

5     La Figure 7 est une photographie montrant l'ouverture de la barrière hématoencéphalique chez les rates traitées par le facteur toxique :

Fig. 7A : dans une large zone périventriculaire, une diffusion d'immunoglobulines du sang s'observe ;  
10 l'immunomarquage est diffus ;

Fig. 7B : à plus fort grossissement, on observe une auréole d'IgG autour d'un vaisseau ;

Barre : A 20  $\mu$ m, B 40  $\mu$ m

La Figure 8 représente la réactivité microgliale-  
15 macrophagique :

Fig. 8A : chez les témoins, on observe des cellules OX42<sup>+</sup> dans le striatum ; la microglie est sous forme quiescente, le marquage est faible ; très peu de cellules sont observées ;

20     Fig. 8B : chez les animaux traités, on note une modification morphologique des cellules OX42<sup>+</sup> et une augmentation de leur nombre ;

Fig. 8C : à plus fort grossissement de Fig. 8B, cellule microgliale quiescente ;

25     Fig. 8D : à plus fort grossissement de Fig. 8B, cellule microgliale réactive de type ramifié ;

barre : A, B, 20  $\mu$ m   C, D, 40  $\mu$ m

La Figure 9 illustre des foyers de microglie réactive dans le tronc cérébral :

30     Fig. 9A : foyer de cellules OX42<sup>+</sup> dans le tronc cérébral ;

Fig. 9B : à plus fort grossissement, les cellules OX42<sup>+</sup> sont réactives de type ramifié et pseudopodique ;

Barres : A 10  $\mu$ m   B 20  $\mu$ m

35     La Figure 10 illustre la dégradation myélinique :

Fig. 10A : substance blanche du cervelet où l'on note une atténuation de l'immunomarquage dans une large zone bien délimitée ;

Fig. 10B : faisceau de myéline dans le cervelet où on observe une forte dégradation myélinique ;

Fig. 10C : agrandissement de Fig. 10B : dégradation myélinique très nette ;

Barre : A, B, 10  $\mu$ m C 20  $\mu$ m

La Figure 11 représente une co-détection des astrocytes et des cellules TUNEL<sup>+</sup> par rapport aux astrocytes dans des biopsies de patients (SEP) :

Fig. 11A : astrocyte réactif (bleu) entouré de cellules TUNEL<sup>+</sup> (marron) ;

Fig. 11B : cellules GFAP<sup>+</sup> de petite taille, faiblement marquées par l'anti-GFAP, dépourvues de prolongements cytoplasmiques et situées à la périphérie de la plaque ;

Fig. 11C : cellules TUNEL<sup>+</sup> dans la paroi vasculaire, à phénotype endothélial ;

Barre : 40  $\mu$ m

#### EXEMPLE 1 : DESCRIPTION DU MATERIEL ET DES TECHNIQUES UTILISEES

##### a) Le facteur gliotoxique

Les échantillons de LCR ou d'urine, ou les monocytes sont prélevés chez des patients atteints de SEP. Le facteur toxique est purifié partiellement après traitement sur une colonne échangeuse d'ions, puis sur une colonne de séparation par exclusion, conformément à l'Exemple 11 de la demande de brevet PCT/FR95/00178. Le facteur gliotoxique est constitué majoritairement par une fraction légère de 17 Kd et par une fraction lourde de 21 Kd, qui ont toutes deux une forte affinité pour la concanavaline.

La séparation du facteur gliotoxique est ci-après détaillée, à partir de surnageants bruts de culture de monocytes/macrophages de patients atteints de SEP.

\* Préparation des cultures de  
5 monocytes/macrophages de patients atteints de SEP

Le milieu de culture comprend du RPMI1640 (Boehringer), de la pénicilline-streptomycine (bioMérieux), de la L-glutamine (bioMérieux), du pyruvate de sodium (Boehringer), des acides aminés non-essentiels  
10 100x (Boehringer), du sérum humain AB prélevé chez des donneurs sains et séronégatifs pour tous les virus transmissibles par les dérivés sanguins connus (voir PERRON et al., The Lancet, vol 337, pages 862-863, 6 Avril 1991).

15 Les cellules lymphoïdes sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>3</sup> Primaria (Falcon) après avoir été séparées du plasma et des autres éléments figurés sanguins par centrifugation sur gradient de Ficoll (Lymphoprep®, Flow). Pour obtenir ces cellules lymphoïdes,  
20 50 ml de sang sont prélevés par ponction veineuse sur tube stérile hépariné (lithium héparine). Le sang et l'héparine sont bien mélangés aussitôt le sang prélevé. Alternativement, le sang peut être prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA. Il est important ensuite, de  
25 transporter immédiatement les tubes maintenus à +4°C au laboratoire, où ceux-ci seront manipulés sous hotte de culture à flux laminaire "biohazard" dans des conditions stériles. Pour une culture de monocytes, on prépare un milieu "RPMI" qui comprend 100-150 ml de milieu RPMI 1640,  
30 un mélange de pénicilline et streptomycine, 4% de L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels Boehringer (100X). On prépare également 3 tubes stériles à fond conique de 50 ml (Falcon) contenant 10 ml du milieu "RPMI" sus-décrit, et 4 tubes stériles de  
35 50 ml avec 20 ml de Ficoll au fond. Les tubes héparinés sont ouverts pour pipeter le sang, le déposer dans les

tubes contenant du milieu et le mélanger doucement au milieu sus-décrit. On prélève 5 ml de milieu "RPMI" et l'on rince la paroi des tubes héparinés. Il faut accompagner ce rinçage d'un grattage léger à l'aide du  
5 bout de la pipette plastique afin de décoller des cellules ayant éventuellement adhéré aux parois du tube, et le déposer dans les tubes contenant le sang dilué dans le milieu "RPMI", en mélangeant doucement le contenu par aspirations/refoulements successifs. Il faut répéter ces  
10 opérations jusqu'à ce que les tubes héparinés soient propres. Il faut ensuite déposer très doucement (sans remous) le sang dilué dans le milieu "RPMI", à la surface du Ficoll dans les tubes de 50 ml puis utiliser du milieu "RPMI" pour rincer le reste de sang dilué et le récupérer  
15 comme précédemment pour le déposer délicatement à la surface des tubes avec le Ficoll. Ensuite, et sans secouer le Ficoll, il faut placer les tubes dans des godets pour centrifugeuse, équilibrer à l'aide de tubes remplis d'eau, et centrifuger à +15°C pendant 20 minutes à 1800 trs/min,  
20 avec un mode de décélération lente. Après centrifugation, on récupère les tubes dans lesquels on enfonce doucement une pipette jusqu'à hauteur de l'interface supérieure "Ficoll/plasma" et l'on aspire doucement la couche blanchâtre située au dessus du Ficoll en décrivant des  
25 cercles concentriques depuis les parois, puis en décrivant des "zig-zags" d'un côté à l'autre de la surface du Ficoll. On place le milieu aspiré dans des tubes de 50 ml, on le dilue dans au moins 3 fois le volume de milieu RPMI et l'on mélange doucement par inversion des tubes bouchés  
30 stérilement. On centrifuge ensuite les tubes à +15°C pendant 10 minutes à 1800 trs/min, avec un mode de décélération lente. Après centrifugation, on jette en versant lentement mais régulièrement le surnageant de ces tubes, tout en veillant à ce que le culot blanchâtre de  
35 cellules ne se détache pas. On resuspend le culot dans 10 ml de milieu "RPMI" par aspirations/refoulements

successifs et on centrifuge la suspension à +15°C pendant 10 minutes à 1800 trs/min, avec un mode de décélération lente. Par prélèvement ou par 50 ml de sang prélevé, on prépare deux petits flacons de culture en plastique électropositif (Falcon "PRIMARIA") de 75 cm<sup>3</sup> et 10 ml de milieu "RPMI" auquel on aura ajouté 15% de sérum humain "AB" (SH) sus-décrit. Après centrifugation, on élimine le surnageant comme précédemment, on resuspend doucement le culot dans 5 ml de milieu "RPMI" avec 15% de SH et l'on répartit les cellules resuspendues dans les flacons placés à plat et à peine soulevés. La suspension est aussitôt répartie en remuant chaque flacon à plat. Les tubes de centrifugation sont rincés avec 5 ml de milieu "RPMI" à 15% SH, et la suspension est ajoutée et répartie dans les deux flacons, comme précédemment. Avantageusement, tous les milieux utilisés pour ces étapes sont à 37°C (réchauffés au bain marie). Une fois les flacons refermés, ils sont tenus à plat dans une étuve humide à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'au lendemain matin. Le lendemain matin, il convient de bien aspirer tout le surnageant avec les cellules en suspension, de rincer les flacons deux fois avec 4 ml de RPMI seul, en laissant "tremper" 5 minutes à chaque fois et en relevant lentement le flacon avant d'aspirer tout le milieu restant, afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. On remplit ensuite les flacons de 5 ml de milieu RPMI à 15% de SH, on les replace à l'étuve et l'on veille à ne pas les bouger pendant 4 h. Dès cette étape, il convient de toujours remplir les flacons placés debout en dirigeant le jet sur la paroi supérieure afin de ne pas détacher les cellules en cours d'adhésion, puis, par la suite, affectées par un effet cytopathogène éventuel. Les suspensions cellulaires ainsi recueillies 24 h après la mise en culture, sont centrifugées à +15°C pendant 10 minutes à 1800 trs/min, avec un mode de décélération lente. Eventuellement, le culot de cellules peut être repris dans du sérum de veau foetal avec 10% de

DMSO (Diméthyl sulfoxyde) pour être congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou dans l'azote liquide selon une procédure de maintien de cellules viables. Le surnageant correspondant est ensuite centrifugé à 3000 trs/min pendant 30 min afin d'éliminer les débris cellulaires, et le surnageant clarifié est aliquoté, répertorié comme échantillon à 24 h de culture, soit J1, puis stocké au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après 48 h dans l'étuve, on sort les flacons, le surnageant est aspiré délicatement, et, comme précédemment, centrifugé à 3000 trs/min pendant 30 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant clarifié est aliquoté, répertorié comme échantillon à 3 jours de culture, soit J3, puis stocké au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les flacons sont aussitôt remplis avec 5 ml de milieu RPMI à 5% SH et replacés dans l'étuve. A partir de ce moment, le milieu de culture ne contient plus que 5% de SH et cette proportion sera utilisée pour tous les renouvellements de milieu. Les milieux des flacons sont ensuite prélevés, stockés sous aliquots de milieu clarifié des débris cellulaires, à  $-80^{\circ}\text{C}$  comme précédemment, et remplacés par du milieu "RPMI" à 5% de SH, tous les trois ou quatre jours, jusqu'à ce que ne persiste plus aucune cellule adhérente et réfringente à l'observation microscopique dans le flacon.

\* Séparation du facteur gliotoxique

Les échantillons de surnageants de culture sont regroupés (J1 à J final) après décongélation et sont préalablement chauffés 30 min à  $56^{\circ}\text{C}$  et centrifugés 10 min à 1500 trs/min, puis le surnageant est récupéré et, éventuellement, dialysé à  $4^{\circ}\text{C}$  dans 2 fois 20 volumes de tampon D-PBS, une première fois pendant 2 h, et une deuxième durant la nuit. Le surnageant ainsi recueilli constitue l'échantillon à partir duquel le facteur gliotoxique sera séparé, selon la technique décrite dans la demande de brevet PCT/FR95/00178.

b) Injections cérébrales intraventriculaires



Les expériences sont réalisées sur des rates Lewis, adultes (2 mois), pesant entre 200-250 g au début de l'expérience. Les animaux sont anesthésiés à l'hydrate de chloral (400 mg/kg) injecté par voie intrapéritonéale.

5 Les injections de la solution toxique, 5 à 10  $\mu$ g de protéines actives dans 5  $\mu$ l d'une solution de PBS (tampon phosphate salin) stérile sont réalisées par des méthodes stéréotaxiques, dans le ventricule latéral gauche, (AP:0,8, L:1,5. P:4). Les injections se font à  
10 l'aide d'une micropipette (22  $\mu$ m de diamètre) accrochée à une seringue Hamilton de 25  $\mu$ l.

Les animaux sont sacrifiés, 10 jours (n=9) après l'opération. Six animaux témoins sont soumis à des injections dans les mêmes conditions par 5  $\mu$ l d'une  
15 solution de PBS stérile, et sont sacrifiés au même temps. Tous les animaux reçoivent une dose létale d'hydrate de chloral (0,5-g/kg), puis perfusés par voie transcardiaque à travers l'aorte ascendante, par une solution de paraformaldéhyde 4 % dans du tampon phosphate 0,12 M. Les  
20 cerveaux avec moelles cervicales sont postfixés dans le même fixateur pendant une heure à 4°C, ensuite cryoprotégés dans une solution de sucrose 10 % dans du tampon phosphate 0,12 M pendant 2 jours, puis congelés dans de l'isopentane refroidi dans l'azote liquide à -40°C  
25 et stockés à -80°C. Des coupes au cryostat verticofrontales, de 10  $\mu$ m d'épaisseur, sériées toutes les 100  $\mu$ m sont recueillies sur des lames gélatinées 1 %.

Certaines coupes sont colorées au violet de Crésyl, ou à l'hématoxyline éosine.

30 c) Anticorps

Pour marquer les astrocytes, on utilise un anticorps monoclonal anti-protéine gliale fibrillaire acide (anti-GFAP) (BOEHRINGER) dilué au 1/200. La myéline est visualisée par un anticorps anti-protéine basique de  
35 myéline (anti-MBP) (BOEHRINGER) dilué au 1/500. Des anticorps monoclonaux OX42 dilués au 1/500 (SEROTEC) sont

utilisés pour identifier les cellules microgliales-macrophagiques.

Lors d'une ouverture de la BHE, des éléments spécifiques du sang sont détectés dans le parenchyme cérébral telles que les immunoglobulines (Dusart & col 1993). Un anticorps anti-immunoglobuline de rat (AMERSHAM) dilué au 1/200 est utilisé pour visualiser une éventuelle rupture de la BHE.

Un anticorps anti-FVIII est utilisé pour visualiser les cellules endothéliales.

Dans tous les cas, les coupes sont incubées avec les anticorps primaires aux concentrations indiquées durant une nuit à 4°C, ils sont dilués dans du PBS 0,1 M 2 % BSA (sérumalbumine bovine), 0,3% Triton-X. Les coupes destinées à être marquées par l'anti-MBP sont préalablement dégraissées dans de l'alcool absolu contenant 5 % d'acide acétique, pendant 25 minutes à 4°C, ensuite immergées dans des bains d'alcools à 95 puis à 70, pendant 5 minutes pour chacun, et rincées plusieurs fois dans du PBS.

L'anticorps secondaire (Anti-IgG de souris biotinylé, AMERSHAM) dilué au 1/200 est mis en présence des coupes, pendant environ 2 heures à température ambiante.

Les coupes sont ensuite incubées avec le complexe streptavidine-biotine / peroxydase (1/200). L'activité peroxydase est révélée en présence de son substrat spécifique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la DAB. Pour saturer les peroxydases endogènes, les coupes sont incubées pendant 10 minutes dans du tampon phosphate 0,1 M (pH = 7,4) contenant 0,4 % d'eau oxygénée, ensuite sont immergées dans une solution de PBS contenant 2% de BSA pendant 30 minutes avant d'être incubées avec les anticorps primaires.

Certaines coupes traitées par les anticorps anti-GFAP, anti-FVIII sont révélées selon la technique ABC-AP.

Ces coupes sont ensuite traitées selon la méthode TUNEL ci-après décrite.

d) Méthode TUNEL (Gavrieli & col 1992)

- 5 Les coupes sont traitées à la protéinase K (BOEHRINGER) (20 µg/ml) pendant 15 minutes, ensuite incubées avec la TdT et l'UTP biotinylé, pendant une heure à 37°. Les coupes sont ensuite mises en présence du complexe streptavidine-biotine / peroxydase (1/200)
- 10 (AMERSHAM). L'activité peroxydase est révélée en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la DAB.

Certaines coupes traitées selon la méthode TUNEL seront contre-colorées à l'hématoxyline.

15 **EXEMPLE 2 : RESULTATS**

- Les résultats présentés dans cet exemple portent sur les observations réalisées sur des rates sacrifiées 10 jours après l'opération. On cherche en particulier à établir si le facteur gliotoxique induit une mort de
- 20 cellules gliales et de cellules endothéliales. A cet effet on décrit la progression de la réponse microgliale macrophagique, l'état de la BHE, de la myéline et de la morphologie astrocytaire.

- 25 a) Impact du facteur toxique sur les astrocytes
- La lésion est bilatérale, et affecte la distribution, l'orientation et l'organisation de l'ensemble des astrocytes du SNC du rat. Les astrocytes présentent de profondes modifications morphologiques
- 30 variables selon leurs localisations. Les lésions seront décrites, en partant des espaces périventriculaires vers les espaces subpiaux.

Conformément aux figures 1B, 2B, 2C, 3B et 3C, on distingue plusieurs cas :

- 35 - les cellules GFAP-positives (GFAP<sup>+</sup>) de morphologie anormale, avec de longs prolongements

cytoplasmiques, s'organisent en palissades et sont orientées vers les ventricules latéraux (Fig. 1B) ;

- en s'écartant des espaces ventriculaires, notamment dans le striatum, on observe des cellules GFAP d'aspect fibreux densément imbriquées les unes dans les autres, formant des nodules (Fig. 2B, 2C). Ces nodules sont observés dans l'ensemble des régions télencéphaliques ;

- les zones immunoréactives, formées normalement par les prolongements astrocytaires autour des vaisseaux, ne sont pas visibles autour de la plupart des vaisseaux chez les rates traitées par le facteur toxique (Fig. 3B) ;

- on observe des astrocytes présentant des formes réactives, caractérisés par une hypertrophie de leurs somas et un épaississement de leurs prolongements, ils sont densément marqués à la GFAP et se disposent souvent en foyers cellulaires à proximité de certains vaisseaux (Fig. 3C) ;

- dans le cortex, les cellules GFAP<sup>+</sup> situées dans les couches profondes perdent leurs prolongements et se raréfient ; dans les couches superficielles, les astrocytes dont les prolongements cytoplasmiques s'orientent vers la pia normalement ont une morphologie anormale et une orientation anarchique (Fig. 4B).

La distribution des astrocytes chez les rats témoins est normale et comparable à celle décrite par Kalman & Hajos 1989. L'astrogliose, chez les témoins sans gliotoxine (c'est-à-dire auxquels a été injecté un placebo), est limitée au niveau du site d'injection.

b) Fragmentation de l'ADN cellulaire induite par le facteur toxique dans le SNC du rat (mise en évidence par la méthode TUNEL)

Des cellules donnant une réponse positive dans la méthode de TUNEL (TUNEL<sup>+</sup>) sont observées dans tout le SNC du rat. Elles sont plus fréquentes dans la paroi des ventricules où elles correspondent à des cellules de type

épendymaire (Fig. 5A). On les observe dans le cervelet (Fig. 5B), quelques-unes sont localisées dans la couche des grains (Fig. 5C), d'autres dans les parois des vaisseaux sanguins situés dans les espaces subarachnoïdiens (Fig. 5D) et intraparenchymateux, et aussi dans les plexus choroïdes (Fig. 5E). Certaines cellules TUNEL<sup>+</sup> possèdent de l'ADN fragmenté dans leur cytoplasme. D'autres cellules TUNEL<sup>+</sup> sont observées dans les plexus choroïdes (Fig. 5F).

Des cellules GFAP<sup>+</sup> sont TUNEL<sup>+</sup>. Elles sont observées dans l'ensemble du SNC (Fig. 6A, 6B, 6C). Des cellules TUNEL<sup>+</sup> marquées au FVIII sont aussi observées (Fig. 6D). Il faut noter que le marquage du FVIII dans ce cas-là est très faible.

Aucun cas de fragmentation d'ADN n'est observée chez les animaux témoins. Une ou deux cellules TUNEL<sup>+</sup> sont parfois visibles au site d'injection de la solution placebo. Mais la présence des cellules TUNEL<sup>+</sup> disséminées dans le parenchyme cérébral est spécifique des animaux gliotoxine<sup>+</sup>.

#### c) Ouverture de la barrière hématoencéphalique

Une diffusion d'immunoglobulines du sang est observée dans le parenchyme cérébral, chez tous les animaux traités par le facteur toxique. Elle est plus marquée dans les espaces périventriculaires, autour de certains vaisseaux (Fig. 7A, 7B). Ce phénomène n'est pas observé chez les témoins.

#### d) Réactivité microgliale-macrophagique

Les cellules OX42<sup>+</sup> présentent des formes réactives caractéristiques, on distingue des formes ramifiées et pseudopodiques. Elles sont plus nombreuses par rapport à ce qui est observé chez les rates témoins (Fig. 8B). Dans certaines régions du tronc cérébral et du cervelet, on observe des petits foyers de cellules OX42<sup>+</sup> (Fig. 9A, 9B).

e) Demyélinisation induite par le facteur toxique chez le rat

Des aires de démyélinisation sont visualisées par une atténuation du marquage de la MBP dans des foyers bien délimités. Ces foyers sont très nettement observables dans le tronc cérébral ainsi que la substance blanche 5 cérébelleuse (Fig. 10A). Des cas de dégradation myélinique sont également observés épars dans pratiquement tout le SNC du rat (Fig. 10B, 10C).

### EXEMPLE 3 : INTERPRETATION DES RESULTATS ACQUIS

10 Le facteur toxique isolé et purifié à partir du LCR, d'urine ou de culture de monocytes, de patients atteints de SEP, injecté dans le LCR du rat induit des lésions affectant des cellules de type glial et aussi endothélial du SNC. Le facteur toxique est probablement 15 distribué par le LCR qui circule dans les ventricules, puis dans les espaces subarachnoïdiens. Il est absorbé par les vaisseaux arachnoïdiens, puis les sinus veineux. Des cellules TUNEL<sup>+</sup> se situent dans les parois ventriculaires (cellules de type épendymaire) et dans les vaisseaux 20 arachnoïdiens. Une atteinte des cellules épendymaires modifierait l'interface entre le LCR et le cerveau, ce qui est susceptible de favoriser la formation de lésions dans les espaces périventriculaires. Dans la SEP, les plaques de lésion sont situées à proximité du système 25 ventriculaire et sont fréquentes autour des veinules. Certains auteurs ont évoqué l'existence d'un agent de nature enzymatique, ou immunitaire ou autre, diffusant du LCR ou du sang, dans le cerveau (voir Marburg 1936, Lumsden 1970). Le facteur toxique injecté semble circuler 30 dans le LCR, et a une action ciblée sur certains types cellulaires. Il serait donc diffusible du LCR vers le parenchyme cérébral où il touche certaines populations cellulaires.

La lésion affectant les astrocytes est complexe. 35 On observe une fragmentation d'ADN d'astrocytes suggérant une mort par apoptose de ces cellules. Les astrocytes

induisent la formation et le maintien de la BHE, par le biais de leurs extensions cytoplasmiques périvasculaires (pieds astrocytaires), même s'ils ne la constituent pas (Stewart & Wiley 1981). L'altération des astrocytes périvasculaires suggère une rétraction des pieds astrocytaires pouvant par conséquent modifier l'étanchéité de la BHE. Aussi la fragmentation de l'ADN de cellules endothéliales cérébrales suggère des modifications des propriétés intrinsèques de ces cellules qui pourraient conduire à une ouverture de la BHE. La détection d'immunoglobulines du sang dans le cerveau du rat en constitue une preuve. Il est possible que ce soit les modifications morphologiques des astrocytes périvasculaires, qui se produisent très tôt, qui conduisent à la modification du phénotype des cellules endothéliales et donc à l'altération de la BHE.

Plusieurs auteurs insistent sur des anomalies au niveau des vaisseaux sanguins dans les plaques chroniques de SEP (Jellinger 1969, Weller 1985, Gay & Esiri 1991). Les cellules endothéliales des capillaires contiennent des immunoglobulines et l' $\alpha 1$ -antiglobuline indiquant l'augmentation du transport vésiculaire transendothélial à la périphérie des plaques. On a noté également le passage de médiateurs immunitaires humoraux et cellulaires, témoignant aussi d'une ouverture de la BHE (Compston & col 1989).

On a également observé une astroglie, à proximité de certains vaisseaux, et une prolifération très marquée d'astrocytes fibreux dans l'ensemble du SNC du rat. Les astrocytes après stimulation, produisent une variété de molécules immunorégulatrices. Elles incluent IL-1 (Fontana & col 1982), l'IL-6 (Frei & col 1989), IFN- $\gamma$  (Tedeschi & col 1986) et aussi du TNF- $\alpha$  (Robbins & col 1987, Sawada & col 1989, Chung & col 1990). Le TNF- $\alpha$  est toxique pour les cellules endothéliales (Deguchi & col 1989, Ishii & col 1992). Il a un rôle important dans la

progression des lésions dans la SEP (Sharief & col 1991). Il existe une corrélation entre l'ouverture de la BHE et le taux de production de TNF- $\alpha$  chez les patients atteints de SEP (Sharief & Thompson 1992). Le TNF- $\alpha$  a un effet  
5 cytotoxique direct sur les oligodendrocytes et provoque les destructions myéliniques (Selmaj & Raine 1988). Il induit une prolifération d'astrocytes in vitro (Barna & col 1990).

On sait aussi que les astrocytes se retrouvent au  
10 carrefour des réactions inflammatoires. Ils représentent les cellules immunocompétentes résidentes dans le SNC (Fontana & col 1987). Une altération primaire des astrocytes dans les processus lésionnels de la SEP pourrait à la fois déstabiliser l'équilibre homéostatique  
15 du SNC, et déclencher une cascade d'événements de type inflammatoire qui aboutiraient à une démyélinisation.

Des facteurs solubles d'origine monocyttaire ou lymphoïde pourraient altérer l'activité biologique des astrocytes (Chung & col 1990) et induire des cytokines,  
20 certaines potentiellement démyélinisantes.

On a observé une prolifération microgliale macrophagique chez les rates traitées par le facteur toxique. Cette réactivité s'observe sous forme de foyers OX42<sup>+</sup> localisés dans la substance blanche, et plus dans le  
25 tronc cérébral. La microglie activée produit aussi des cytokines, tel le TNF- $\alpha$  (Frei & Fontana 1989, Hetier & col 1990), l'IL-6 (Frei & col 1989) et autres. Une réactivité microgliale macrophagique a été décrite dans la SEP et pourrait participer aux processus de démyélinisation  
30 (Woodroffe & col 1986, Esiri & col 1987).

On observe également une démyélinisation. Les aires de démyélinisation sont très nettement délimitées dans le tronc cérébral et la substance blanche cérébelleuse. Ces aspects sont très proches de ceux qui  
35 sont observés dans la SEP. Les résultats obtenus suggèrent que le facteur toxique isolé à partir du LCR de patients



SEP induit des lésions à large étendue dans le SNC du rat. Ces lésions se rapprochent par leur nature et leur distribution de certaines des lésions observées dans la SEP, notamment la démyélinisation, l'astrogliose  
5 fibrillaire, la réactivité microgliale macrophagique et l'ouverture de la BHE avec formation d'un oedème objectivé par la diffusion d'immunoglobulines plasmatiques intra-parenchymateuse.

Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser ce  
10 nouveau modèle animal expérimental pour étudier la neuropathologie de la SEP et mettre au point des stratégies à visée thérapeutique pour inhiber la synthèse ou bloquer l'action du facteur gliotoxique et à contrecarrer ses effets dans un modèle in vivo.

15

**EXEMPLE 4 : EVALUATION DE L'EFFICACITE  
THERAPEUTIQUE D'UN TRAITEMENT DE LA SCLEROSE EN PLAQUES A  
L'AIDE DU MODELE ANIMAL INDUIT PAR LA GLIOTOXINE**

Premièrement, un échantillon de facteur  
20 gliotoxique purifié est préparé selon la description faite dans l'Exemple 1 et dans la demande de brevet PCT/FR95/00178.

Deuxièmement, une série de rats Lewis femelles est sélectionnée selon les critères décrits dans l'Exemple 1.

25

Une trentaine ou plus de ces animaux reçoivent au jour 0, une dose de facteur gliotoxique en injection stéréotaxique intraventriculaire, selon le protocole décrit dans l'Exemple 1. Aux jours 0, 1, 3, 8, et 10 (par exemple) après injection du facteur gliotoxique, ils  
30 reçoivent une dose adéquate d'un agent thérapeutique tel que le Rolipram®, l'interféron  $\beta$ , l'azathioprine, le cyclophosphamide, un antisérum anti-gliotoxine, ou tout autre moyen thérapeutique à évaluer. Cette série "A" correspond aux animaux malades (gliotoxine +) traités avec  
35 un produit ou procédé actif, et est susceptible d'être reproduite en plusieurs variantes pour évaluer un

protocole d'administration quantitatif et qualitatif optimal parmi toutes les variantes.

Une trentaine (ou plus) de ces animaux reçoivent au jour 0 une dose de facteur gliotoxique en injection stéréotaxique intraventriculaire, selon le protocole décrit dans l'Exemple 1, mais reçoivent un placebo inactif du traitement défini dans la série A, dans des conditions rigoureusement équivalentes. Cette série "B" correspond aux animaux malades (gliotoxine +) constituant un contrôle positif non-traité.

Une trentaine (ou plus) de ces animaux reçoivent au jour 0, une injection placebo de facteur gliotoxique (tampon d'injection avec de la sérum-albumine), mais reçoivent le protocole thérapeutique actif défini dans la série A. Cette série "C" correspond aux animaux sains (gliotoxine -) constituant un contrôle négatif traité qui permet d'évaluer les effets éventuellement liés au traitement actif, en dehors de l'effet du facteur gliotoxique.

L'efficacité thérapeutique est évaluée en sacrifiant des animaux des séries A, B et C, au jour 10, à un mois, trois mois, six mois, voire un an si nécessaire, après l'injection du facteur gliotoxique ou de son placebo, selon le protocole décrit l'Exemple 1.

Les cerveaux des animaux sont étudiés selon les descriptions techniques de l'Exemple 1.

Les critères suivants sont notamment retenus pour la comparaison entre les animaux des séries A, B et C:

Aspects généraux :

- état général
- perte de poids
- modifications comportementales.

Histopathologie cérébrale (à distance du point d'injection):

- anomalies morphologiques et histologiques des astrocytes (tels que décrites dans les exemples précédents) ;

5 - fragmentation de l'ADN (technique TUNEL positive) dans des cellules astrocytaires principalement, mais éventuellement et notamment épendymaires ou endothéliales ;

10 - ouverture de la BHE visualisée par au moins une zone de diffusion intra-parenchymateuse d'immunoglobulines sériques ;

- activation macrophagique des cellules microgliales ;

- anomalies morphologiques et histologiques des structures myéliniques et/ou des oligodendrocytes ;

15 - présence ou absence d'infiltrats lymphocytaires, notamment péri-vasculaires.

L'efficacité thérapeutique est démontrée si une différence significative (reproductible sur un nombre d'animaux statistiquement analysable) existe entre la  
20 fréquence, l'intensité, la surface, la sommation, des anomalies sus-décrites observées chez les animaux de la série A (gliotoxine +/traitement actif) et ceux de la série B (gliotoxine +/traitement placebo).

L'efficacité thérapeutique est d'autant meilleure  
25 que la différence entre les observations rapportées dans la série A et celles rapportées dans la série C, devient non-significative selon les mêmes critères que précédemment.

Cette efficacité peut être ainsi évaluée selon les  
30 différents protocoles d'application des traitements (séries "A" avec variantes) et l'efficacité à terme, en fonction du temps écoulé après injection du facteur gliotoxique, est évaluée en sacrifiant des animaux de chaque série à des temps croissants comme mentionné ci-  
35 dessus.

**EXEMPLE 5 : OBTENTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES  
ANTI-FACTEUR GLIOTOXIQUE ET/OU DIRIGES CONTRE DES  
MOLECULES INDUITES OU MODIFIEES PAR LES EFFETS DU FACTEUR  
GLIOTOXIQUE**

5           Injection de facteur gliotoxique (intracérébrale, intrapéritonéale, ou IP, intraveineuse, ou IV, intramusculaire, ou IM, ou intradermique, ou ID) à une série d'animaux selon Exemple 1.

          Rappels par injections IP, IV, ID ou IM après un  
10 mois, deux mois, trois mois, voire plus.

          Prélèvement de la rate (organe) de l'animal après un mois, deux mois, trois mois, quatre mois, voire plus.

          Vérification des atteintes neuropathologiques selon l'Exemple 1. Conservation de coupes de cerveau  
15 fixées pour l'étude des anticorps produits.

          Extraction des lymphocytes de la rate et reprise dans milieu de culture en vue de fusion avec cellules transformées adéquates pour l'obtention d'hybridomes sécréteurs d'immunoglobulines.

20           Sélection des clones fusionnés viables.

          Screening des spécificités des anticorps produits par les hybridomes :

          Gliotoxine :

          1- test d'inhibition d'activité:

25           Les suspensions d'anticorps produits par les différents clones sont ajoutées dans des puits de cultures contenant une solution de facteur gliotoxique tel que défini pour le bio-essai décrit dans la demande de brevet PCT/FR95/00178. Des suspensions d'anticorps contrôles  
30 d'animaux injectés avec un placebo de gliotoxine sont ajoutées à des puits témoins. L'activité gliotoxique est mesurée dans chaque puits conformément à la description de la demande de brevet précitée. Toute différence significative obtenue avec une suspension d'anticorps  
35 montrant une activité gliotoxique inférieure à la valeur témoin "plancher" (moyenne des puits avec anticorps

témoins moins trois écart-types), montre une activité anti-gliotoxine inhibitrice.

Ces anticorps inhibiteurs ont un intérêt pour la détection du facteur gliotoxique (ELISA, etc...), mais  
5 aussi pour la thérapeutique anti-gliotoxine (éventuellement, après humanisation des anticorps en substituant la partie constante de l'anticorps avec une chaîne d'Ig humaine et en conservant la partie variable de l'anticorps animal).

10 2- Test sérologique

Une fraction de gliotoxine est exposée aux différentes suspensions d'anticorps selon une technique sérologique adaptée et les anticorps spécifiques sont révélés par une réaction positive.

15 Alternativement, une source de gliotoxine recombinante ou des peptides synthétiques dérivés de sa séquence peuvent être utilisés pour ce screening.

Les clones d'hybridome intéressants sont cultivés ultérieurement pour produire des anticorps monoclonaux.

20 Antigènes tissulaires :

Les tests sérologiques peuvent être appliqués à des antigènes extraits des tissus des animaux malades et comparés avec des tissus équivalents d'animaux témoins pour identifier des molécules induites ou modifiées par  
25 l'effet du facteur gliotoxique.

Ces anticorps peuvent avoir un intérêt diagnostique, voire thérapeutique.

## REFERENCES

- Barna B.P., Estes M.L., Jacobs B.S., Hudson S. (1990) Humain astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha J. Neuroimmunol. 30, 239-243.
- 5 Chung I.Y. et E.N. Benveniste (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes, Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma and IL-1beta. J. Immunol, Vol 144 n°8 pp 2999-3007.
- Compston D.A.S., Morgan, B.P., Campbell, A.K.,  
10 Wilkins, P, Gole, G., Thomas, N.D. et Jasani B. (1989) Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 307-316.
- Deguchi Y., Shibata, N., et Kishimoto, S. (1989)  
15 Enhanced transcription of TNF in symetric vasculitis. Lancet ii, 745-746.
- Esiri M.M. et Reading, M.C. (1987) Macrophage populations associated with multiple sclerosis plaques. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 13. 451-465.
- 20 Fontana A., F. Kristensen, R. Dubs, D. Gemsa, et E. Weber (1982) Production of prostaglandin E and an interleukin - I - like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. J. Immunol 129-2413.
- Fontana (1987) Antigen presentation and tumor  
25 cytotoxicity by interferon-treated microglial cells. Eur J. Immunol. 17, 1271.
- Frei K., U.V. Malipiero, T.P. Leist, R. M. Zinkernagel. M.E. Schwab, et A. Fontana (1989). On the cellular source and function of interleukin-6 produced in  
30 the central nervous system in viral diseases. Eur. J. Immunol. 19:689.
- Frei K., et Fontana, A., (1989) Immune regulatory functions of astrocytes and microglial cells within the central nervous system, Neuroimmuno-networks: physiology  
35 and diseases, Alan R. Liss Inc., : 127-136.

- Gabrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493-501.
- 5           Gay D. et Esiri M. (1991) Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study. *Brain* 114, 557-572.
- Hawkins C.P., Mackenzie F., Toffts P., McDonald W.I., (1991) Patterns of blood- brain barrier breakdown in  
10 inflammatory demyelination. *Brain* 114, 801-810.
- Hétier E., Ayala J., Rousseau A., Denèfle P., et Prochiantz A., (1990) Amoeboid microglial cells and not astrocytes synthesize TNF- $\alpha$  in Swiss mouse brain cell cultures. *European J. Neurosci.*, 2 : 762-768.
- 15           Ishii Y., Partridge C.A., Del Vacchio P.J., et Malik A.B. (1992) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Clin. Invest.* 89, 794-802.
- 20           Jellinger K. (1969) Einige morphologische Aspekte der multiplen Sklerose. *Wien. Z. Nervenheil. Suppl.* II, 12-37.
- Kalman M., et Hajos F., (1989), Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive  
25 astrocytes in the rat brain. I Forebrain, *Exp. Brain Res.*, 78: 147-163.
- Lumsden C.E. (1970) The pathology of multiple sclerosis. IN/ P.J. Vinken and G.W. Bruyn (Eds), *Handbook of clinical Neurol.* Vol. 19 North-holland Publishers.  
30 Amsterdam, PP. 217-309.
- Marburg O. (1936) In/ O. Bumk et O. Foerster (Eds) *Handbuch der Neurologie*, Berlin, pp 546.
- Perron H., Geny C., Laurent A., et al (1989) Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with  
35 reverse transcriptase activity and viral particles. *Res. Virol.* ; 140; 551-561.

Perron H., Geny C., Gratacap B. Laurent A., Lalande B., Perret J., Pellat J., Seigneurin J.M. (1991) Isolation of an unknown retrovirus from CSF. Blood and brain cells of patients with multiple sclerosis. Elsevier Science Publishers B.V. Current concepts in multiple sclerosis H. Wiethöler et al., editors.

Perron H., Lalande B., Gratacap B. et coll. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. Lancet, 1991, 337, 862-863.

Poser C.M. (1993) The pathogenesis of multiple sclerosis. Additional considerations. J. Neurol. Sciences 115 (Suppl.) S3-S15.

Robbins D.S., Y. Shirazi, B.E. Drysdale A. Leiberman, H.S. Shin, et M.L. Shin (1987) Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. J. Immuno. 139:2593.

Sawada M., N. Kondo, A. Suzumura, et T. Marunouchi (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. Brain Res. 491:394.

Selmaaj, K.W. et Raine C.S. (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocytes damage in vitro. Ann. Neurol. 23,339-346.

Sharief M.K. et Hentges R. (1991) Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. N. Eng. J. Med. 325, 467-472.

Sharief M.K. et Thompson E.J. (1992) Association between tumor necrosis factor to blood-brain damage in patients with active multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 38,27-34.

Stewart W.J. et Wiley M.J., (1981), Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras, Dev. Biol., 84: 183-192.



Tedeschi B., J.N. Barrett, et R.W. Keane (1986) Astrocytes produce interferon that enhances the expression of H-2 antigens on a subpopulation of brain cells. J. Cell. Biol. 102:2244.

- 5 Thompson A.I., Miller D., Youl & al (1992) Serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing/remitting multiple sclerosis of varying disease duration. Neurology 42, 285-390.

- Waksman B.H. Mechanisms in multiple sclerosis.  
10 Nature 1985. 104-105.

Weller R.O. (1985) Pathology of multiple sclerosis. In: W.B. Matthews, F.D. Acheson, J.R. Batchelor et R.O. Weller (Eds.), McAlpine's Multiple sclerosis. Churchill Living-stone, Edinburgh, pp. 301-343.

- 15 Woodroffe M.N. Bellamy, A.S. Feldmann, M. Davison, A.N. et Cuzner M.L. (1986) Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis: possible role for microglia in lesion growth, J. Neurol. Sci. 74, 135-152.

## REVENDICATIONS

1. Animal mammifère, non humain, modifié sans affecter son génome, caractérisé en ce qu'il possède au moins deux quelconques des signes pathologiques suivants :
  - 5 (a) une barrière hématoencéphalique ouverte ou perméable aux molécules hydrosolubles du sang non spécifiques du parenchyme cérébral ; (b) une atteinte astrocytaire notamment révélée par la désorganisation des réseaux physiologiques, par une disparition des pieds
  - 10 astrocytaires autour des vaisseaux capillaires et par une gliose ; (c) une activation des cellules microgliales ; (d) des plaques de démyélinisation, notamment présentes dans le tronc cérébral et/ou la substance blanche
  - 15 cellules endothéliales du système nerveux central.
2. Animal selon la revendication 1, caractérisé en ce que les lésions selon (e) consistent en une modification de la morphologie et/ou une fragmentation au moins partielle de l'ADN des cellules gliales de type
- 20 astrocytaire.
3. Animal selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il possède au moins deux des signes pathologiques (a), (d) et (e).
4. Animal mammifère, non humain, modifié sans
- 25 affecter son génome, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par inoculation du facteur gliotoxique tel qu'obtenu dans un liquide biologique de patients atteints de sclérose en plaques.
5. Animal selon l'une quelconque des
- 30 revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il appartient à la famille des muridés, en particulier l'animal est un rat.
6. Procédé d'obtention d'un animal selon l'une quelconque des revendications précédentes,
- 35 comprenant les étapes consistant à :

- disposer d'une quantité infectante de facteur gliotoxique, tel qu'obtenu à partir d'un liquide biologique d'un patient atteint de sclérose en plaques,
- inoculer ladite quantité infectante à  
5 l'animal.

7. Utilisation d'un animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour mesurer l'efficacité thérapeutique d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, anti-inflammatoire.

- 10 8. Utilisation d'un animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour mesurer l'efficacité thérapeutique d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, destiné au traitement de la sclérose en plaques.

- 15 9. Utilisation d'un animal selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour déterminer la nocuité ou l'innocuité d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, sur le cerveau pathologique de l'animal.

- 20 10. Procédé pour mesurer l'efficacité d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, anti-inflammatoire, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- disposer d'un animal tel que défini selon  
25 l'une quelconque des revendications 1 à 5,
- administrer ledit procédé thérapeutique notamment agent médicamenteux à l'animal,
- mesurer l'efficacité du procédé thérapeutique en observant la réduction ou l'absence du ou des signes  
30 pathologiques définis dans les revendications 1 à 3, par rapport à un animal témoin malade ayant reçu du facteur gliotoxique, mais n'ayant pas reçu le procédé thérapeutique, et en référence à un témoin normal traité par ledit procédé thérapeutique mais n'ayant pas reçu de  
35 facteur gliotoxique.

11. Procédé pour mesurer l'efficacité d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, destiné au traitement de la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- 5       - disposer d'un animal tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 5,
- administrer ledit procédé thérapeutique à l'animal,
- mesurer l'efficacité du procédé thérapeutique
- 10   en observant la réduction ou l'absence du ou des signes pathologiques définis dans les revendications 1 à 3, par rapport à un animal témoin malade ayant reçu du facteur gliotoxique, mais n'ayant pas reçu le procédé thérapeutique, et en référence à un témoin normal traité
- 15   par ledit procédé thérapeutique mais n'ayant pas reçu de facteur gliotoxique.

12. Procédé pour déterminer la nocuité ou l'innocuité d'un procédé thérapeutique, notamment d'un agent médicamenteux, sur le cerveau pathologique d'un

20 animal tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- disposer dudit animal,
- administrer ledit procédé thérapeutique à
- 25   l'animal,
- mesurer la réponse du procédé thérapeutique par une observation histopathologique du ou des signes pathologiques définis dans les revendications 1 à 3.

13. Procédé de production d'anticorps

30 monoclonaux dirigés contre le facteur gliotoxique et/ou contre des molécules induites ou modifiées par les effets du facteur gliotoxique, comprenant les étapes consistant à fusionner des lymphocytes B prélevés sur un animal tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5, avec

35 des cellules tumorales adaptées à l'obtention

d'hybridomes, et à faire produire par l'hybridome issu sélectionné lesdits anticorps.

14. Anticorps monoclonal dirigé contre le facteur gliotoxique et/ou contre des molécules induites ou  
5 modifiées par les effets du facteur gliotoxique, susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 13.

FIG 1A

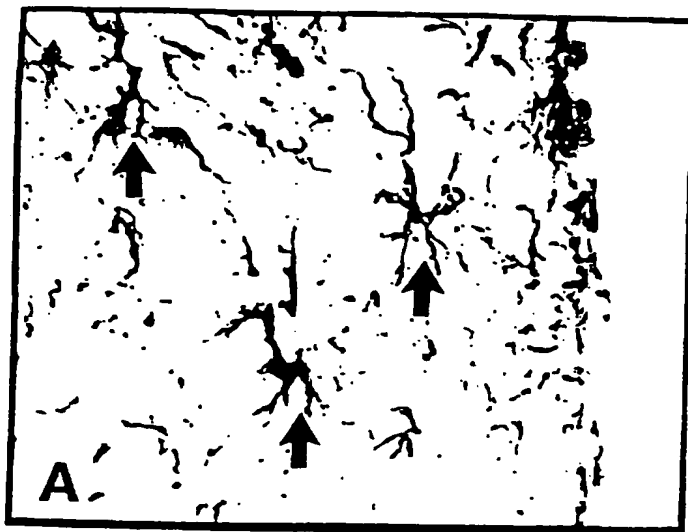


FIG 1B

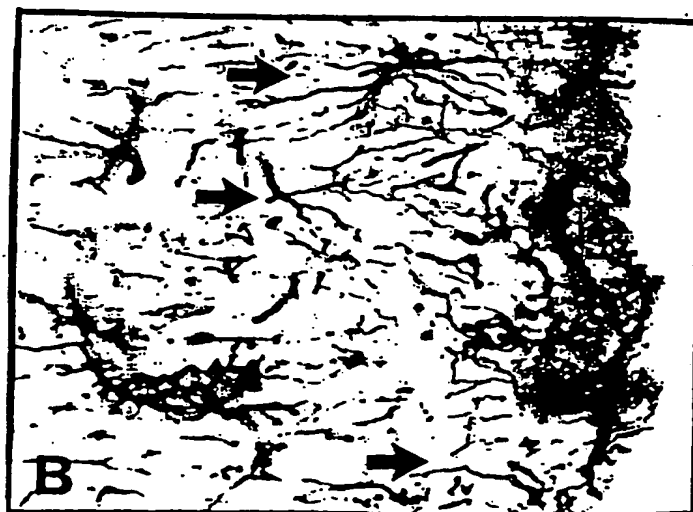


FIG 1C

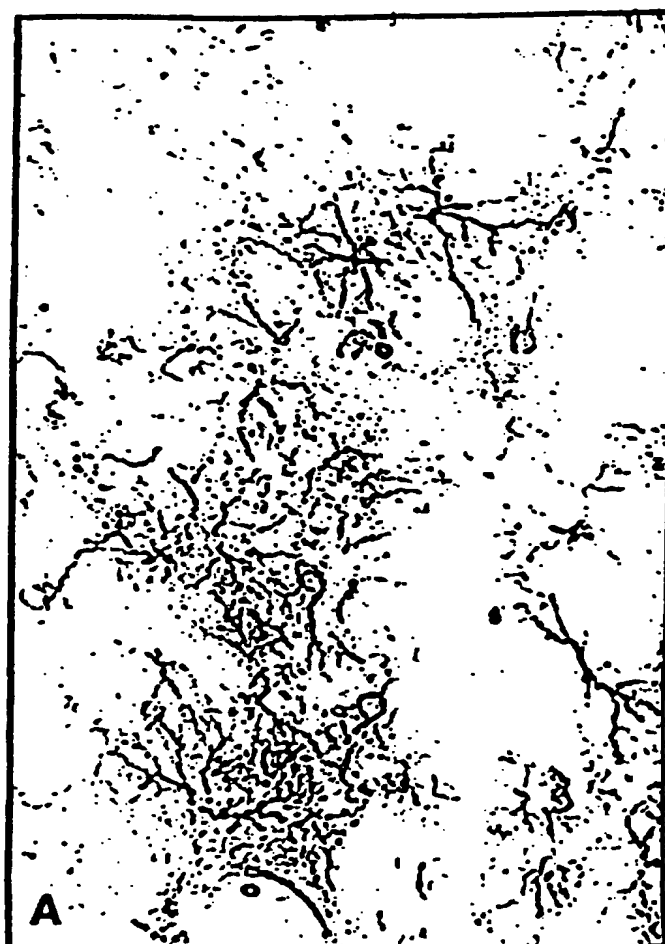


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG1D



FIG2A



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/17

FIG2B

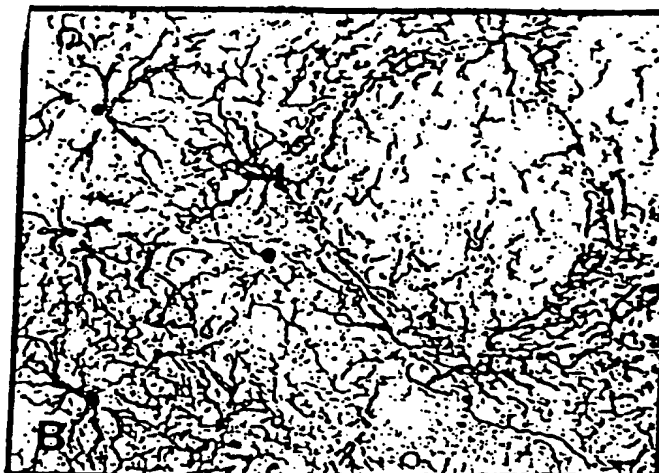


FIG2C

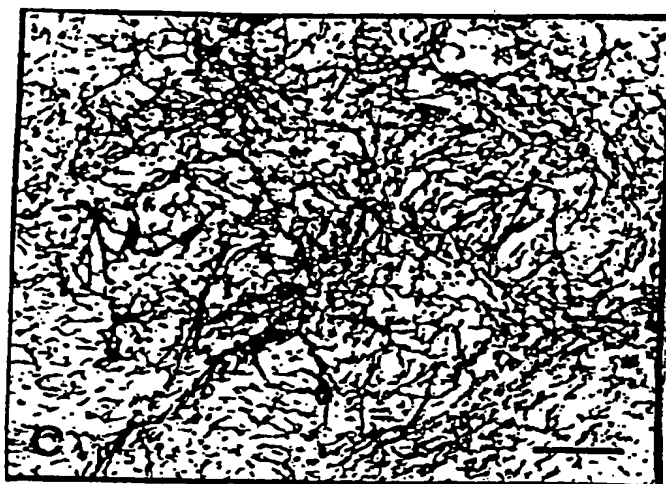


FIG3A



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



4/17



FIG 3B

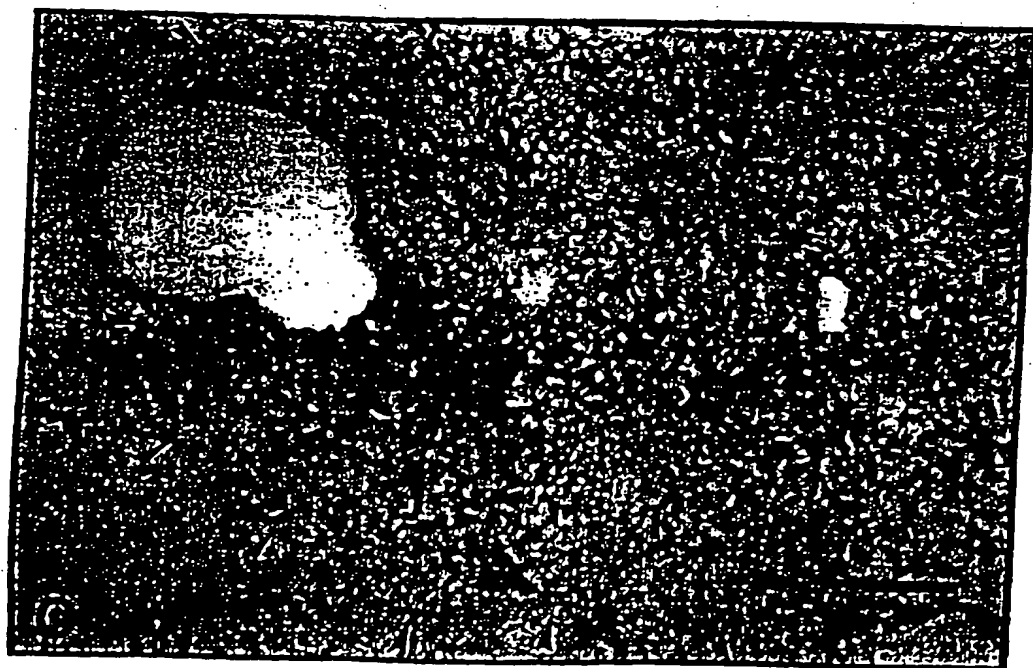


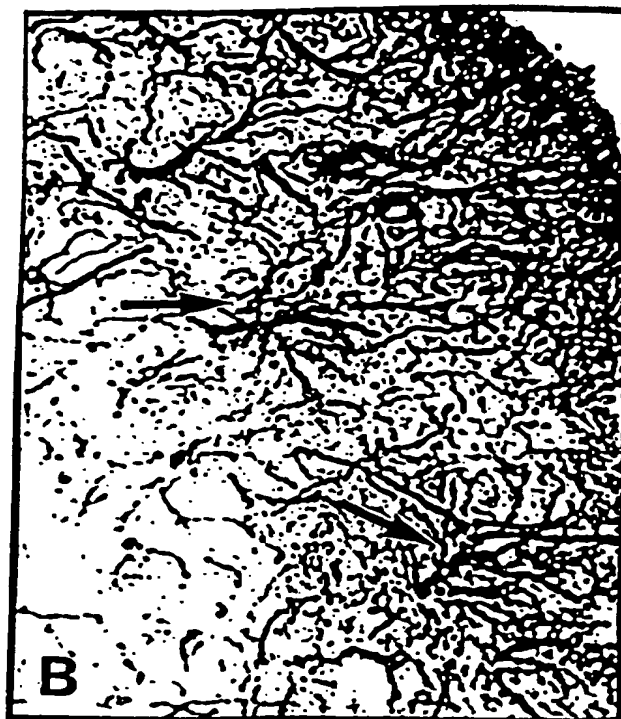
FIG 3C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG4A



FIG4B



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/17

FIG 4C

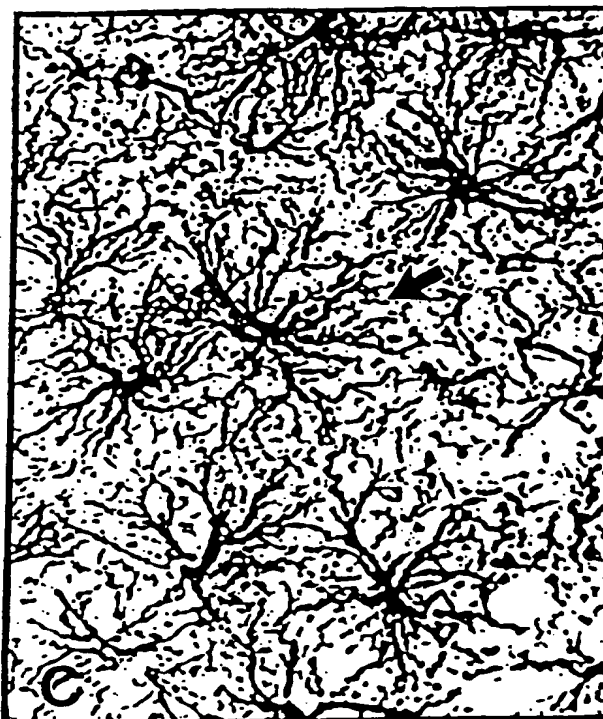
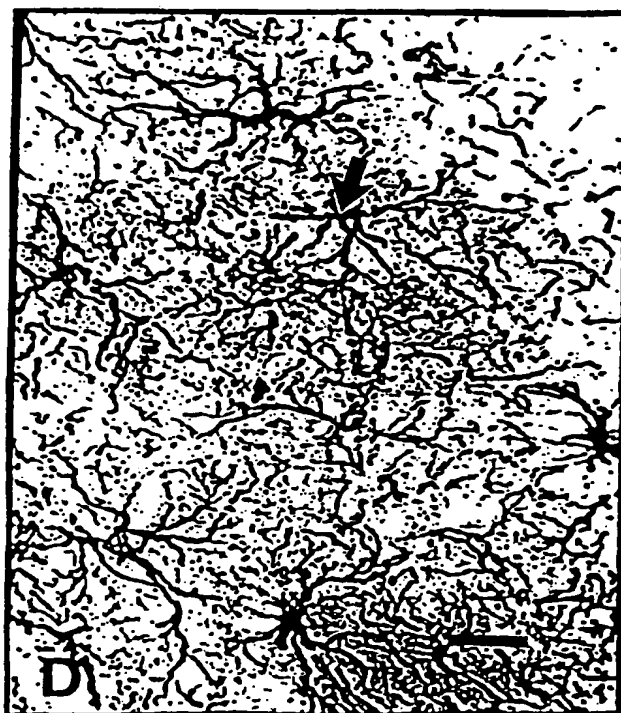


FIG 4D



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

7/17

FIG5A



FIG5B

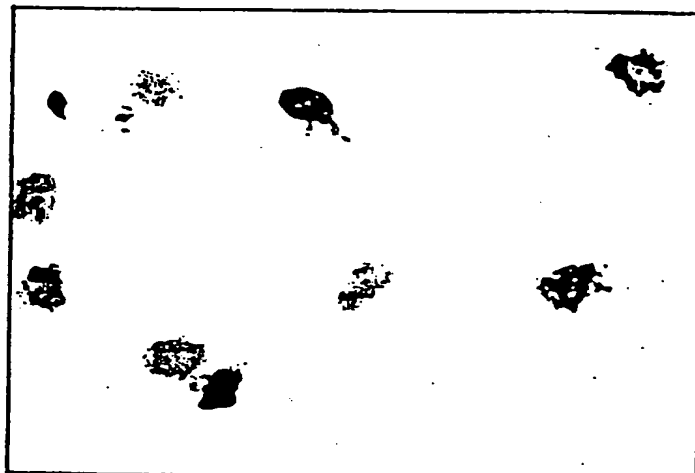


FIG5C



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8/17

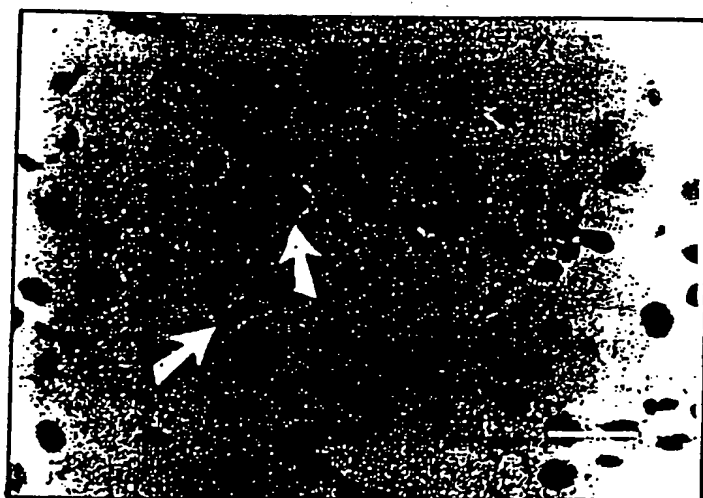
FIG5D



FIG5E



FIG5F

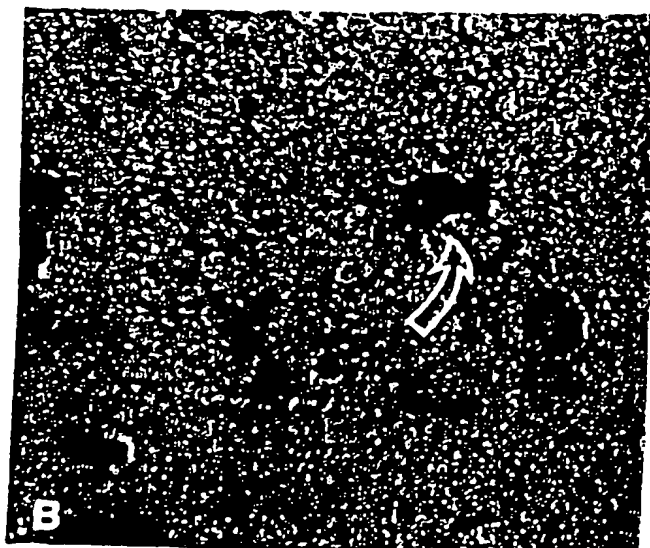


FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG 6A



FIG 6B



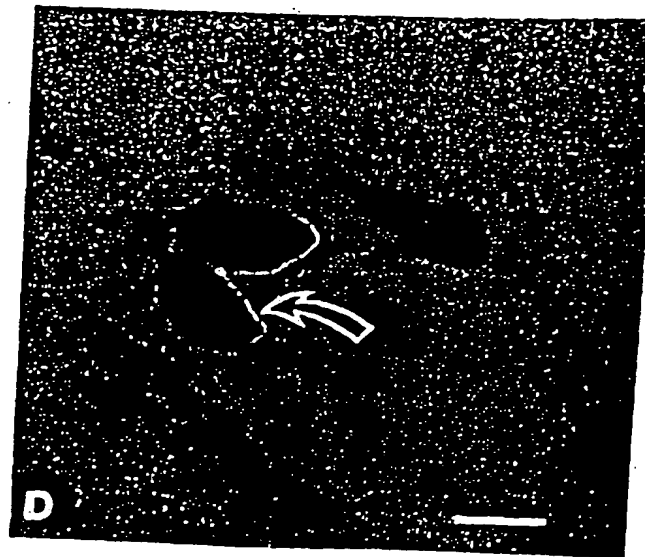
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/17

FIG6C



FIG6D



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/17

FIG 7A

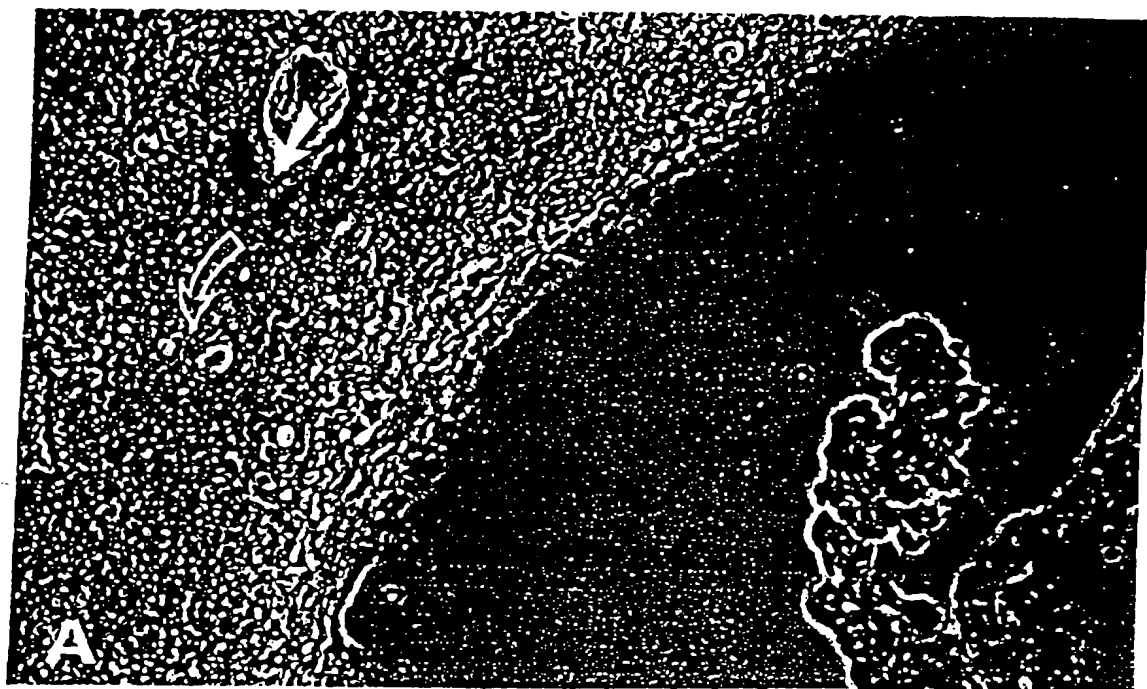
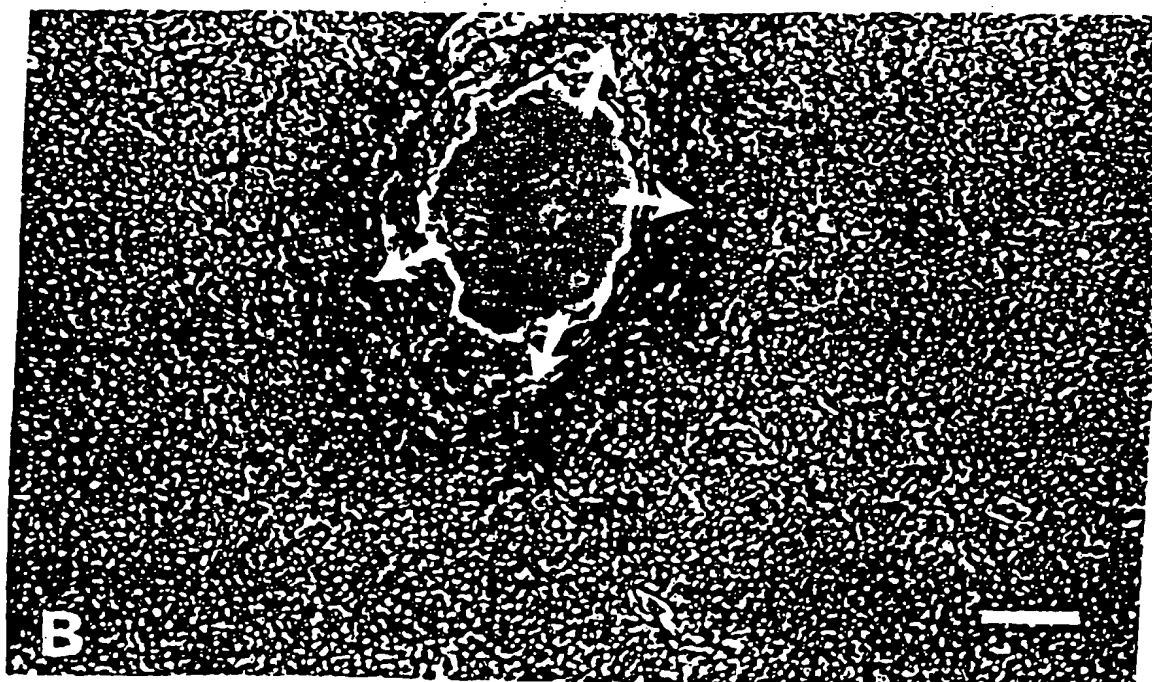


FIG 7B



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



FIG 8A



FIG 8B



FIG 8C

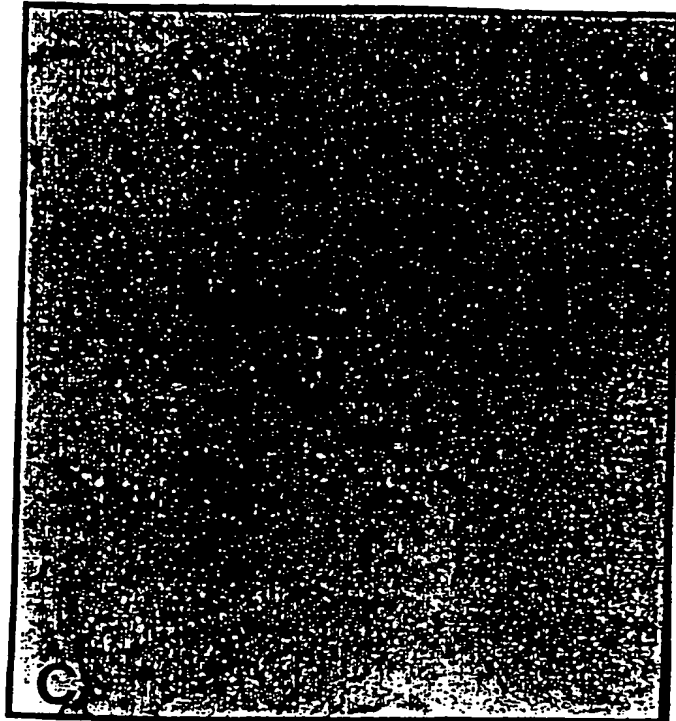


FIG 8D



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG 9A



FIG 9B

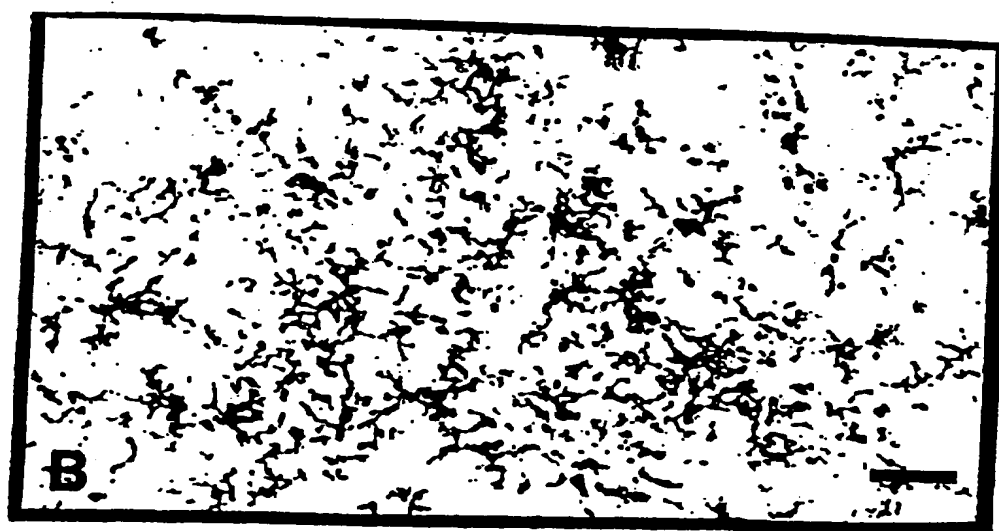
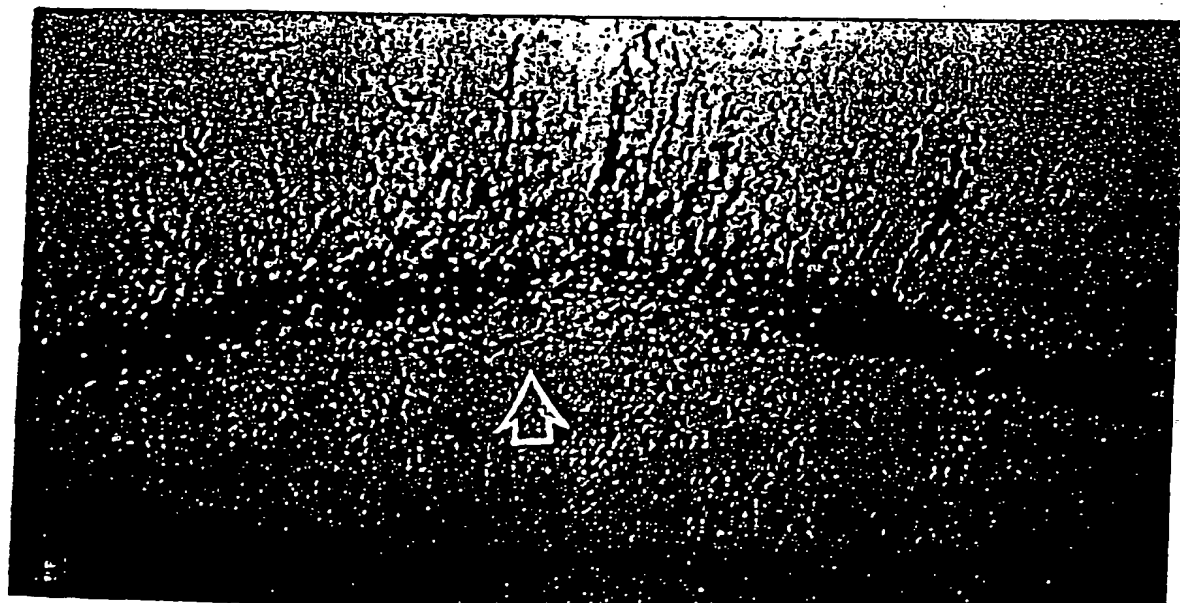


FIG 10A



FIG 10B



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

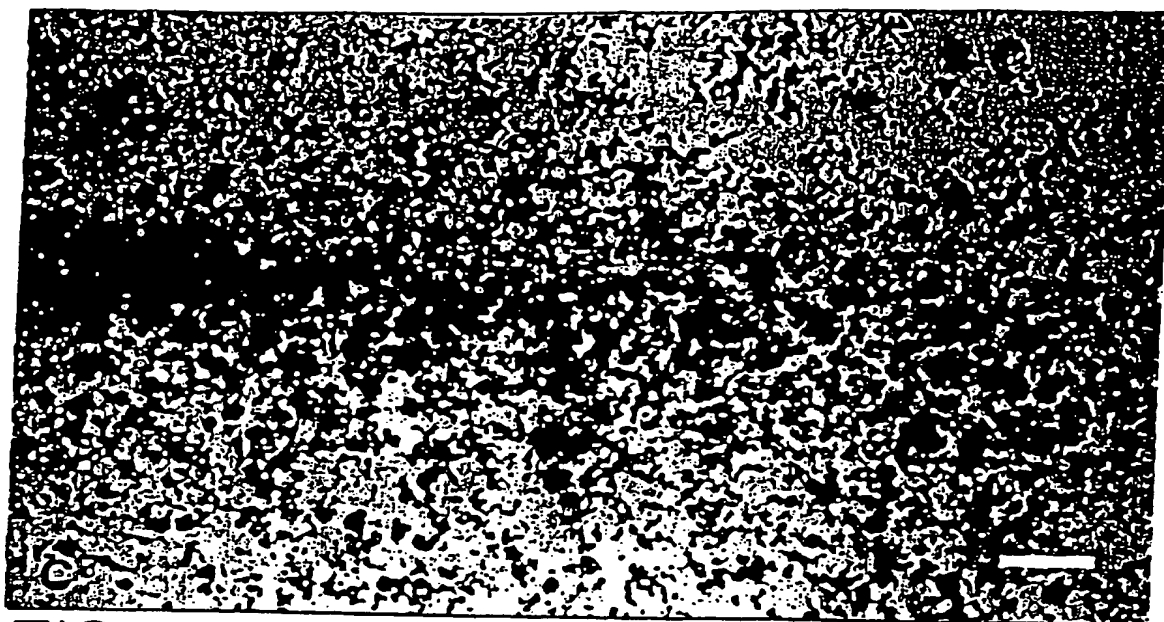
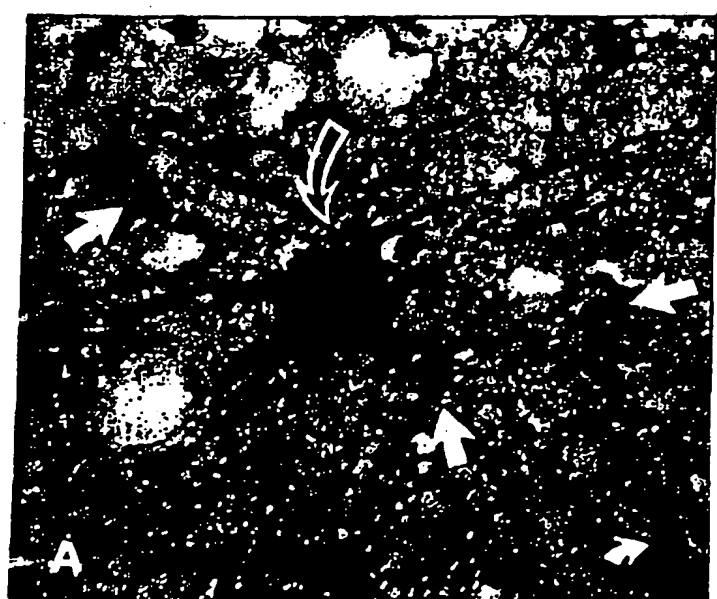


FIG 10 C

FIG 11A



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIG 11B

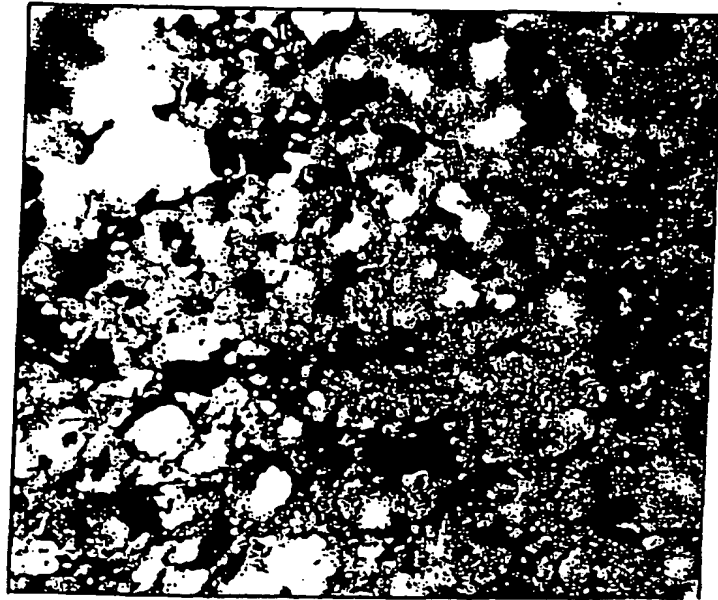
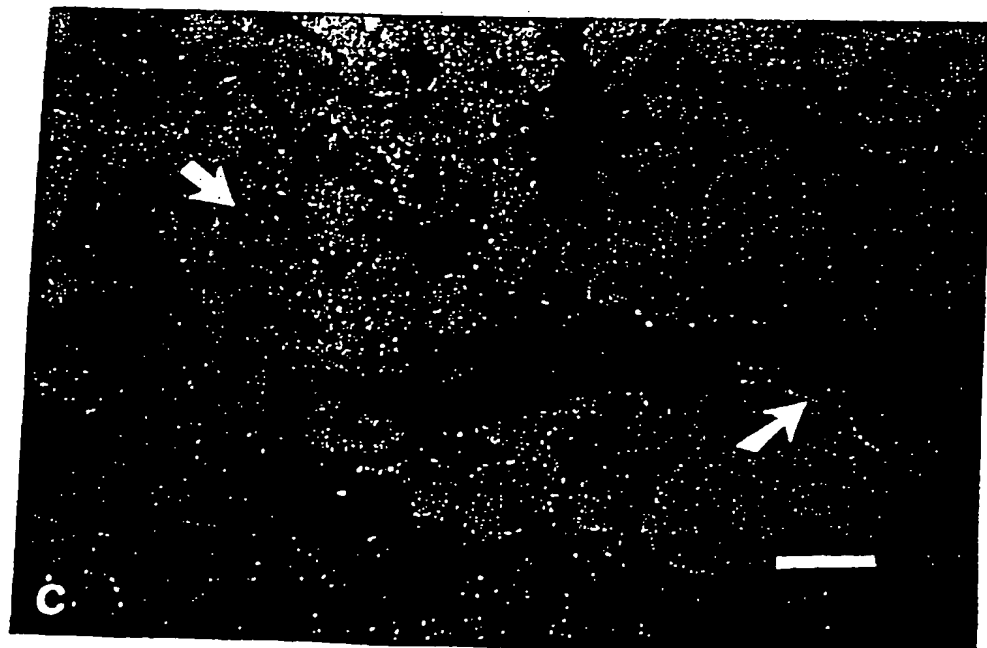


FIG 11C



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No  
PCT/FR 97/00469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A01K67/027 C12Q1/00 C07K14/47 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 21859 A (BIO MERIEUX) 17 August 1995 cited in the application see the whole document ---	14
A	DEVELOPMENTAL BRAIN RESEARCH, vol. 74, no. 1, 16 July 1993, pages 41-50, XP000602617 KRUM, J.M. & ROSENSTEIN, J.M.: "Effect of astroglial degeneration on the blood-brain barrier to protein in neonatal rats" see the whole document --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 1997

Date of mailing of the international search report

03.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/FR 97/00469

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 1, January 1987, pages 47-55, XP000602623 BRAITHWAITE, A.W. ET AL.: "The immunomodulating agent gliotoxin cause genomic DNA fragmentation" see the whole document ---	2,4
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (MICROFILMS), vol. 263, no. 8, 15 March 1988, MD US, pages 3772-3777, XP000602187 EICHNER, R.D. ET AL.: "Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA" see the whole document ---	2,4,5
A	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 36, no. 3, 15 October 1993, pages 315-324, XP002013715 MASTRONARDI, F.G. ET AL.: "Demyelination in transgenic mouse: a model for multiple sclerosis" see the whole document ---	1,8-12
A	EP 0 684 310 A (BAYER-AG) 29 November 1995 see the whole document ---	1,8-12
A	EP 0 685 558 A (BAYER AG) 6 December 1995 see the whole document ---	1,8-12
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 319, no. 4, April 1996, MONTREUIL FR, pages 343-350, XP000602023 RIEGER, F. ET AL.: "Un facteur gliotoxique et la sclérose en plaques" see the whole document -----	1-12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9521859 A	17-08-95	FR 2716198 A	18-08-95
		AU 1815295 A	29-08-95
		CA 2142557 A	16-08-95
		EP 0667354 A	16-08-95
		FI 954876 A	13-10-95
		JP 8511808 T	10-12-96
		NO 954081 A	13-12-95
-----			
EP 0684310 A	29-11-95	EP 0685558 A	06-12-95
		CA 2150092 A	28-11-95
		JP 8051890 A	27-02-96
-----			
EP 0685558 A	06-12-95	CA 2150092 A	28-11-95
		EP 0684310 A	29-11-95
		JP 8051890 A	27-02-96
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D rde Internationale No  
PCT/FR 97/00469

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A01K67/027 C12Q1/00

C07K14/47 C07K16/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A01K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 21859 A (BIO MERIEUX) 17 Août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	14
A	DEVELOPMENTAL BRAIN RESEARCH, vol. 74, no. 1, 16 Juillet 1993, pages 41-50, XP000602617 KRUM, J.M. & ROSENSTEIN, J.M.: "Effect of astroglial degeneration on the blood-brain barrier to protein in neonatal rats" voir le document en entier --- -/-	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Mai 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03.06.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des : Internationale No  
PCT/FR 97/00469

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 1, Janvier 1987, pages 47-55, XP000602623 BRAITHWAITE, A.W. ET AL.: "The immunomodulating agent gliotoxin cause genomic DNA fragmentation" voir le document en entier ---</p>	2,4
A	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (MICROFILMS), vol. 263, no. 8, 15 Mars 1988, MD US, pages 3772-3777, XP000602187 EICHNER, R.D. ET AL.: "Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA" voir le document en entier ---</p>	2,4,5
A	<p>JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 36, no. 3, 15 Octobre 1993, pages 315-324, XP002013715 MASTRONARDI, F.G. ET AL.: "Demyelination in transgenic mouse: a model for multiple sclerosis" voir le document en entier ---</p>	1,8-12
A	<p>EP 0 684 310 A (BAYER AG) 29 Novembre 1995 voir le document en entier ---</p>	1,8-12
A	<p>EP 0 685 558 A (BAYER AG) 6 Décembre 1995 voir le document en entier ---</p>	1,8-12
P,X	<p>COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 319, no. 4, Avril 1996, MONTREUIL FR, pages 343-350, XP000602023 RIEGER, F. ET AL.: "Un facteur gliotoxique et la sclérose en plaques" voir le document en entier -----</p>	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De le Internationale No

PCT/FR 97/00469

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9521859 A	17-08-95	FR 2716198 A	18-08-95
		AU 1815295 A	29-08-95
		CA 2142557 A	16-08-95
		EP 0667354 A	16-08-95
		FI 954876 A	13-10-95
		JP 8511808 T	10-12-96
		NO 954081 A	13-12-95
-----			
EP 0684310 A	29-11-95	EP 0685558 A	06-12-95
		CA 2150092 A	28-11-95
		JP 8051890 A	27-02-96
-----			
EP 0685558 A	06-12-95	CA 2150092 A	28-11-95
		EP 0684310 A	29-11-95
		JP 8051890 A	27-02-96
-----			

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**